Aus der Medizinischen Klinik der Universität Würzburg
Direktor: Prof. Dr. med. H. A. Kühn

UNTERSUCHUNGEN ZUR IN-VITRO NATÜRLICHEN KILLERZELLAKTIVITÄT IM PERIPHEREN BLUT BEI MORBUS CROHN

Inaugural-Dissertation

verfaßt und der

Hohen Medizinischen Fakultät

der

Julius-Maximilians-Universität Würzburg

zur

Erlangung der medizinischen Doktorwürde

vorgelegt von

Jing-Shyan Lin

aus Taipeh

Würzburg, den 27. November 1979

1980

Aus der Medizinischen Klinik der Universität Würzburg
Direktor: Prof. Dr. med. H. A. Kühn

UNTERSUCHUNGEN ZUR IN-VITRO NATÜRLICHEN KILLERZELLAKTIVITÄT IM PERIPHEREN BLUT BEI MORBUS CROHN

Inaugural-Dissertation

verfaßt und der

Hohen Medizinischen Fakultät

der

Julius-Maximilians-Universität Würzburg

zur

Erlangung der medizinischen Doktorwürde

vorgelegt von

Jing-Shyan Lin

aus Taipeh

Würzburg, den 27. November 1979

Referent: Priv. Doz. Dr. med. I. O. Auer

Korreferent: Prof. Dr. med. H.A. Kühn

Dekan: Prof. Dr. K. H. Wulf

Tag der mündlichen Prüfung: 26.2.1980

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der Universität Würzburg

INHALTSVERZEICHNIS

	Seite
A. Einführung	1
B. Material und Methodik	3
I. Patienten- und Kontrollkollektive	3
1. Patienten mit Morbus Crohn (Gruppe CD)	3
2. Normalkontrollen (N-Gruppen)	5
II. Isolierung und "Reinigung" der peripheren (PB) mononukleären Blutlymphozyten	5
III. Bestimmung der Aktivität natürlicher Killerzellen	6
C. Statistik	8
D. Ergebnisse	9
I. Unaufgetrennte Leukozytensuspensionen	9
II. "Gereinigte" Leukozytensuspensionen	9
III. Abhängigkeit der Veränderungen von Krankheitsparametern	11
E. Diskussion	13
F. Zusammenfassung	15
G. Literaturverzeichnis	16

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41543520_0130

A. EINFÜHRUNG

Periphere Blut (PB) Lymphozyten zeigen eine zytotoxische Aktivität gegen eine Reihe von Targetzellen in vitro, ohne daß eine vorausgegangene Sensibilisierung gegen dieses Target nachgewiesen werden kann (TAKASUGI et al., 1973; BEHELAK und RICHTER, 1975). Die Natur der lymphoiden Zellen, die diese "spontane" oder auch "natürliche" Zytotoxizität tragen, ist bis heute nicht zufriedenstellend geklärt. Gegenwärtiges Wissen deutet an, daß diese Zellen, die natürliche Killer (NK)-Zellen genannt werden, sich in mindestens zwei Arten von Zellen unterscheiden lassen. Eine Art scheint nicht adhärente, nicht phagozytierende, Oberflächenmembran-Immunglobulin negative (Smlg-negativ), jedoch Fc-Rezeptor für IgG-positive (FcRIgG-positiv) lymphoide Zellen zu beinhalten (DE VRIES et al., 1974; HERSEY et al., 1975; WEST et al., 1977; BOLHUIS, 1978; PAPE et al., 1978), von denen ein Teil zur T-Zellinie gehört (HERSEY et al., 1975; WEST et al., 1977; BOLHUIS, 1978; PAPE et al., 1978). Die andere Population besteht aus einem T-Lymphozytensubset, bei dem FcRIgG zumindest nicht funktionell an der NK-zellytischen Aktivität beteiligt ist (BOLHUIS, 1978; EREMIN et al., 1978).

Hinsichtlich einer möglichen biologischen Signifikanz der NK-Zellzytotoxizität ist von Interesse, daß die NK-Zellaktivität eine Rolle bei der Infektabwehr gegen virale Infekte spielen mag (LEMON et al., 1977). Zusätzlich wurde gezeigt, daß die NK-Zellaktivität durch Interferon aktiviert wird (TRINCHIERI und SANTOLI, 1978). Da des weiteren gezeigt wurde, daß eine erniedrigte NK-Zellaktivität in Relation zu schwerer Tumorlast gefunden wird (TAKASUGI et al., 1977; HERBERMANN, 1977), daß sich ein schneller Anstieg der NK-Zellaktivität nach Immuntherapie mit BCG (TRACEY, 1977) findet, des weiteren bei Mäusen mit sehr niederer Leukämierate eine sehr hohe NK-Zellaktivität (ZARLING et al., 1975) vorliegt, und sich eine positive Korrelation zwischen Tumorresistenz gegen syngene Tumorzellen in vivo und der NK-Zellaktivität in vitro findet (PETRANYI et al., 1976; HALLER et al., 1977), wird diskutiert, daß die NK-Zellaktivität eine Rolle im Rahmen der Tumorkontrolle des

Immunsystems ("immune surveillance") spiele (HALLER et al., 1977).

Beim Morbus Crohn wird eine mögliche Beteiligung eines viralen Agens - sei es nun als ätiologisches Agens oder lediglich als Passagiervirus - diskutiert (GITNIK, 1976). Des weiteren wurde berichtet, daß die leicht, jedoch signifikant vermehrt gefundenen malignen Tumoren von besonders hoher Malignität sind (FIELDING et al., 1972; WEEDON et al., 1973). Deshalb schien es von Interesse, die NK-Zellaktivität im peripheren Blut (PB) bei Patienten mit Morbus Crohn zu untersuchen. Wegen der berichteten Abhängigkeit der NK-Zellaktivität von Geschlecht und Alter (SANTOLI et al., 1976) wurden die bei Morbus Crohn-Patienten erhaltenen Ergebnisse verglichen mit Ergebnissen, die durch gleichzeitige Testung von alters- und geschlechtsgleichen Gesunden erhalten wurden. Des weiteren wurde eine Gruppe von Patienten mit entzündlichen infektiösen Darmerkrankungen, außer Morbus Crohn und Collitis ulzerosa (UC) in die Untersuchungen als Kontrolle eingeschlossen (letztere wurde Gruppe D genannt).

B. MATERIAL UND METHODIK

I. PATIENTEN- UND KONTROLLKOLLEKTIVE

1. Patienten mit Morbus Crohn (Gruppe CD)

34 Patienten mit Morbus Crohn wurden hinsichtlich der natürlichen Killerzellaktivität (NK-Zellaktivität) im peripheren Blut untersucht. Diese Gruppe CD bestand eigentlich aus zwei Untergruppen, der Gruppe CD 1 und CD 2.

Gruppe CD 1 bestand aus einer selektionierten, konsekutiven Serie von 16 neu diagnostizierten Crohn-Patienten, die somit niemals mit den bei Morbus Crohn üblichen Medikamenten wie Salizylazosulfapyridin (SASP), Steroiden oder Azathioprin (AZA) behandelt worden waren. Die meisten dieser Patienten hatten zudem eine sehr kurzdauernde Krankheitsdauer.

In der Gruppe CD 2 wurden 18 Crohn-Patienten zusammengefaßt, die langdauernde Erkrankungen hatten und von denen die meisten somit bereits mit Medikamenten wie SASP (n=16), Steroiden (n=13) oder AZA (n=1) behandelt worden waren. Zum Zeitpunkt der Untersuchung waren alle Patienten für wenigstens drei Wochen therapiefrei, d.h. frei von SASP, Steroiden und AZA.

Eine weitere Charakterisierung der Patienten hinsichtlich der Diagnosekriterien, Krankheitsaktivität, Krankheitsdauer und Ausdehnung der Erkrankung sowie Alter der Patienten ist in der Tabelle 1 wiedergegeben. Die Krankheitsaktivität wurde mit Hilfe des "Crohns disease activity index" (CDAI, WEST et al., 1976) bestimmt.

Erkrankte Kontrollen (Gruppe D): 11 Patienten mit entzündlichen Darmerkrankungen, außer Morbus Crohn und Colitis ulcerosa (UC) wurden als erkrankte Kontrollgruppe mit den Crohn-Patienten untersucht.

Die einzelnen Erkrankungen waren: Salmonellose (n=5), unspezifische nicht bakterielle Gastroenteritis (n=3), Divertikulitis coli (n=2), bakterielle Überwanderung des Dünndarms (n=1).

Tabelle 1: Klinische Parameter der Patienten mit M. Crohn und der entsprechenden Kontrollen

Gruppe n	CD 1 16	NCD 1 16	CD 2 18	NCD 2 18
Alter (Jahre)				
$\bar{x} \pm$ SE	30.7±3.5	29.3±4.0	28.1±1.8	29.7±2.4
Bereich (Jahre)	19 - 67		16 - 45	
Dauer der Erkrankung (Monate)				
$\bar{x} \pm$ SE	24.8±6.7		59.7±8.0	
Aktivität (CDAI)				
$\leq$ 110	7		6	
111-200	3		4	
$\geq$ 201	6		8	
Ort der Erkrankung				
Ileum	5		8	
Ileum + Kolon	9		9	
Kolon alleine	2		1	

SE: Standard Abweichung vom Mittelwert

2. Normalkontrollen (N-Gruppen)

Parallel zu jedem Crohn-Patienten bzw. mit jedem Patienten aus der erkrankten Kontrollgruppe (Gruppe D) wurde einer gesunden Kontrolperson gleichzeitig Blut entnommen. Die gewonnenen Lymphozyten wurden gleichzeitig mit denen des entsprechenden, über Alter und Geschlecht gepaarten Crohn- bzw. erkrankten Kontrollpatienten untersucht. Somit wurden insgesamt 45 gesunde Kontrollpersonen getestet. Diese Normalkontrollen bildeten die Gruppen NCD 1, NCD 2, NCD und ND.

II. ISOLIERUNG UND "REINIGUNG" DER PERIPHEREN (PB) MONONUKLEÄREN BLUTLYMPHOZYTEN

Es wurden zwei Methoden zur Gewinnung von Effektorzellen für die natürliche Killerzellaktivität angewandt.

In der ersten Methode wurden Effektorlymphozyten von heparinisierten PB (10 U/ml) durch die Dichtegradienten-Zentrifugation mit Hilfe eines Ficoll-Ronpakon-Gradienten nach BOYUM (1968) in der Modifikation nach AUER et al., 1978, gewonnen. Die so erhaltenen "unaufgetrennten" Zellsuspensionen wurden in RPMI 1640 (Gibco, Gran Island, New York, USA) aufgenommen, das mit Glutamin (2mM), Penicillin (50 U/ml), Streptomycin (100 µg/ml) vervollständigt worden war.

In der zweiten Methode wurden die peripheren Blutlymphoyzten wie folgt gewonnen:

Zuerst wurden die phagozytierenden Zellen des peripheren Blutes durch Präinkubation mit Carbonyleisen enthaltendem "Lymphozytenseparierendem" Reagenz ("Technicon Instruments", Tarrytown, New York, USA) in einem Verhältnis von 1 : 4 gemischt und für 90 Minuten bei 37°C unter leichter Rotation inkubiert. Diese Suspensionen wurden dann auf einem Ficoll-Ronpakon-Gradienten nach BOYUM (1968) zentrifugiert. Die mononukleären Zellsuspensionen, erhalten aus dem an der Interphase liegenden Zellring, wurden nach Waschen mit RPMI 1640 dann des weiteren in Plastikflaschen gegeben. Dort wurden sie auf der

Breitseite der Plastikflaschen für eine Stunde bei 37°C inkubiert. Im Anschluß daran wurden die Zellen dekantiert, so daß die plastikadhärenten Zellen in den Plastikflaschen zurückblieben. Dieser Vorgang wurde einmal wiederholt.

Die Lebensfähigkeit der Zellen wurde in allen Suspensionen mit Hilfe der Tryanblau-Ausschlußmethode bestimmt. Diese lag immer über 97 %.

III. BESTIMMUNG DER AKTIVITÄT NATÜRLICHER KILLER-ZELLEN

Die NK-Aktivität wurde in Microtiterplatten mit U-Boden (Greiner-Plastik, Nürtingen, Deutschland) mit Hilfe eines ^{51}Cr-Freisetzungs-Assay mit einer etablierten Lymphoblastenzellinie (humane Lymphoblastenzellinie LIK) als Target nach TRINCHIERI et al., (1973) und SANTOLI et al. (1976) bestimmt. Die Targetlymphoblasten tragen die HLA-Phenotypen: A 3, B 12, B 15, B 27, Bb 4a, Cb 2, Cb 5. Gleiche Volumina von Targetlymphoblasten (20×10^6 Zellen/ml) wurden mit 0,1 ml $Na_2{}^{51}CrO_4$ (spezifische Aktivität 200-500 Ci/mmol) gemischt, 20 min. bei 37°C in 5 % CO_2 95 % Luft-Gemisch inkubiert und dann 3 x in PBS gewaschen, die mit fötalem Kälberserum (FCS) unterstützt war. Die Targetlymphoblasten wurden in RPMI 1640 mit Glutamin (2 mM), Penicillin (50 U/ml) mit Streptomycin (100 µg/ml) resuspendiert. Effektorlymphozyten waren sowohl periphere Blutlymphozyten, die als "unaufgetrennte" Zellsuspension (siehe bei Isolierung und "Reinigung" der peripheren mononukleären Blutzellen) und "gereinigte" Zellsuspensionen, d.h. mononukleären Zellsuspensionen, die an plastikadhärenten und phagozytierenden Zellen verarmt waren. Die Effektorzellen wurden in einer Konzentration von 1×10^7 lebende Zellen in RPMI 1640, das mit Glutamin (2 mM), Penicillin (50 U/ml) und Streptomycin (100 µg/ml) vervollständigt war, aufgenommen und des weiteren auf Konzentrationen von 8×10^6, 4×10^6 und 2×10^6 pro Milliliter verdünnt.

Der Zytotoxizitätstest wurde im Triplikat durchgeführt. Jedes Loch (Well) in der Microtiterplatte erhielt 1 x 10^4 Targetlymphoblasten in 0,03 ml und des weiteren 0,03 ml des hitzeinaktivierten (56°C, 30 Min.) FCS, wenn es sich um Löcher für die Gesamtfreisetzung (C), spontane Freisetzung (S) und spontane zellvermittelte Zytotoxizität (spC) handelte. Nach 30 Minuten Inkubation bei 4°C wurden 0,1 ml Effektorzellen, in Konzentrationen wie oben angegeben, zu jedem der spC-Löcher (spC) gegeben, wogegen die Löcher für die Gesamtfreisetzung (C) 0,1 ml Zaponin (10 %ig Zaponin in RPMI 1640, Coultier Electronics, Dunstable, England) erhielten. Die spontanen Freisetzungslöcher (S) erhielten 0,1 ml RPMI 1640, das, wie oben wiederholt beschrieben, vervollständigt war. Für den Test selbst wurde für vier Stunden bei 37°C in einer 97 %igen Luft - 5 %ige CO_2-Atmosphäre inkubiert. Danach wurden die Microtiterplatten bei 4°C bei 1000 g für 5 Minuten zentrifugiert. 0,1 ml der Überstände wurden von jedem Loch entnommen und auf die ^{51}Cr Radioaktivität mit Hilfe eines Berthold Gammascint BF 530 untersucht.

Die NK-Zellaktivität wurde mit Hilfe des Prozentsatzes "spezifische ^{51}Cr-Freisetzung" (R) bestimmt. Der Prozentsatz spezifische ^{51}Cr-Freisetzung (R) wurde wie folgt kalkuliert:

$$R = \frac{spC\ (cpm) - S\ (cpm)}{C\ (cpm) - S\ (cpm)} \times 100.$$

C. STATISTIK

Die Ergebnisse sind als Mittelwert ($\bar{x}$) $\pm$ 1 Standardabweichung (SE) angegeben.

Der Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test wurde zur Beurteilung der Signifikanz von Differenzen zwischen den verschiedenen Patientengruppen (Gruppen CD und Gruppe D) zu den zugehörigen gleichzeitig getesteten gesunden Kontrollen verwendet. Der Mann-Withney-U-Test wurde zur statistischen Auswertung der übrigen Vergleiche herangezogen. Die Signifikanz von Korrelationen wurde im Spearman-Rang-Korrelationstest (SR) untersucht.

D. ERGEBNISSE

I. UNAUFGETRENNTE LEUKOZYTENSUSPENSIONEN

Die NK-Zellaktivität, ausgedrückt in Prozent spezifische ^{51}Cr-Freisetzung aus den lymphoblastoiden Targetzellen, war in der Gruppe der 34 Crohn-Patienten signifikant niedriger als bei den entsprechenden Normalkontrollen (siehe Abbildung 1). Allerdings war auch die Aktivität in der Gruppe D signifikant

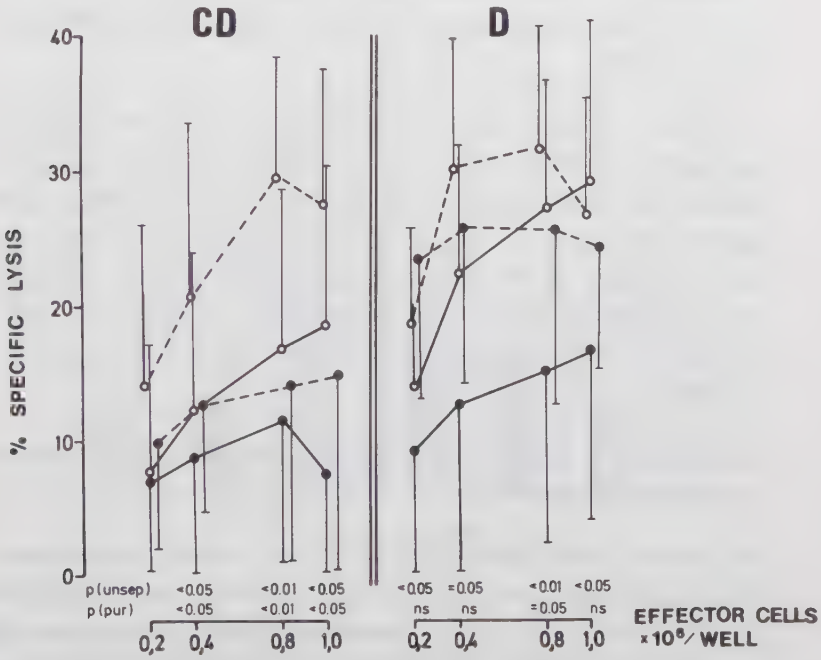

Abb. 1: NK-Zellaktivität (% spezifische Lyse) von unaufgetrennten (durchgezogene Linie) und "gereinigten" (unterbrochene Linie) Leukozytenpopulationen von Patienten mit M. Crohn und Kontrollen. Punkte: Patienten wie angegeben. Offene Kreise: Korrespondierende Normalkontrollen wie angegeben.

niedriger als in der Gruppe ND (Abbildung 1), so daß die NK-Zellaktivität in der Gruppe Crohn und in der Gruppe D (erkrankte Kontrollen) vergleichbar war.

II. "GEREINIGTE" LEUKOZYTENSUSPENSIONEN

Die Vorbehandlung der Leukozytensuspension zur Erniedrigung des Anteiles phagozytierender und plastikadhärenter Zellen resultierte in einem hochsignifikantem Anstieg der NK-Zellaktivität bei den Patienten mit Morbus Crohn (Abbildung 1). Die Signifikanzen waren wie folgt: Gruppe CD: 0,4 und $1,0 \times 10^6$ Effektorzellen/Loch: $p < 0,05$, jeweils. $0,8 \times 10^6$ Effektorzellen/Loch: $p < 0,005$.

Aber selbst nach dieser Vorbehandlung der Zellen war die NK-Zellaktivität bei den Crohn-Patienten (n=13) immer noch signifikant niedriger als bei den entsprechenden Normalkontrollen (Abbildung 1). Dies war vor allem deshalb der Fall, da auch letztere Gruppe, d.h., die Normalkontrollen, einen signifikanten Anstieg in der NK-Zellaktivität zeigten, wenn gereinigte Suspensionen mit unaufgetrennten Suspensionen verglichen wurden. Der Anstieg war mit $p < 0,01$ für alle untersuchten Lymphozyten- zu Targetzellverhältnisse hoch signifikant.

Die Gruppe CD 1 wie auch die Gruppe CD 2 zeigten das eben beschriebene Verhalten in gleicher Weise.

Ein ähnlicher Anstieg wurde auch in der Gruppe D und der entsprechenden Kontrollgruppe ND beobachtet ($p = 0,05$ für jedes Effektorzell Targetzellverhältnis). Im Gegensatz zu den Verhältnissen bei Morbus Crohn-Patienten war jedoch bei den erkrankten Kontrollen die NK-Zellaktivität in den gereinigten mononukleären Zellsuspensionen nurmehr geringfügig niedriger als bei den entsprechenden Normalkontrollen (Abbildung 1).

III. ABHÄNGIGKEIT DER VERÄNDERUNGEN VON KRANKHEITSPARAMETERN

Bei den Crohn-Patienten insgesamt war die Erniedrigung der spezifischen ^{51}Cr-Freisetzung im Rahmen der NK-Zellaktivität unabhängig von der Krankheitsaktivität gefunden worden. Dies war sowohl bei ungereinigten als auch gereinigten Suspensionen der Fall (Abbildung 2). In den gereinigten Suspen-

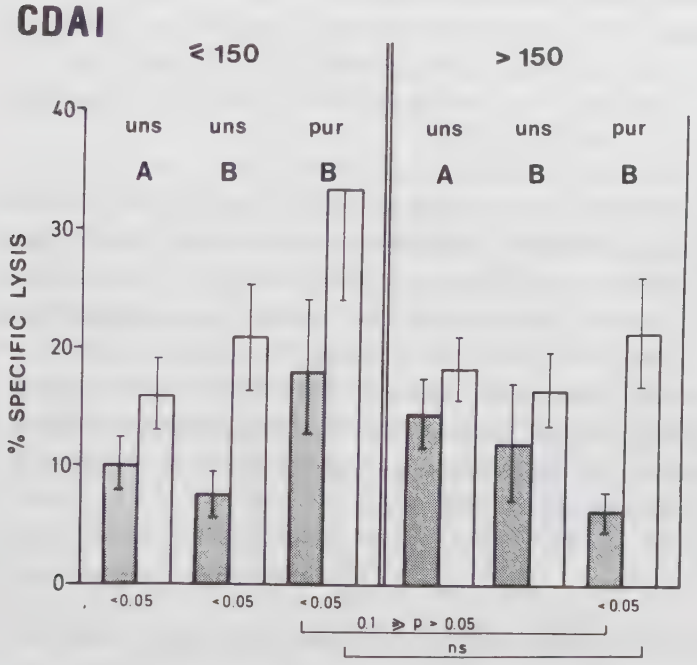

Abb. 2: NK-Zellaktivität (% spezifische Lyse) von Crohn Patienten (dunkle Säulen), getrennt nach aktiver (CDAI > 150) und inaktiver Erkrankung (CDAI < 150) und Normalkontrollen (weiße Säulen). Uns: unaufgetrennte Zellen; pur: "gereinigte" Zellen. A: Gesamt-Gruppe CD (n=34) und Normalkontrollen. B: Morbus-Crohn-Patienten und Normalkontrollen, bei denen sowohl unaufgetrennte als auch "gereinigte" Zellsuspensionen untersucht wurden.

sionen fiel jedoch darüberhinaus auf, daß ein zusätzlicher supressiver Einfluß der Krankheitsaktivität vorlag. So hatten aktive Crohn-Patienten (CDAI >150) einen sehr starken Trend, der die statistische Signifikanz nur knapp verfehlte ($0,1 > p > 0,05$), zu einer niedrigeren NK-zellspezifischen Freisetzung von ^{51}Cr als die inaktiven Patienten mit Morbus Crohn (Abbildung 2). Dieser Einfluß der Krankheitsaktivität war vor allem hervorgerufen durch die Patienten mit langdauernder, bislang wiederholt therapierter Erkrankung. Bei diesen korrelierte die NK-Zellaktivität umgekehrt mit der Krankheitsaktivität, sowohl bei den unaufgetrennten mononukleären Zellsuspensionen (SR:-0,4757, $n=18$, $p < 0,05$) als auch den "gereinigten" mononuklearen Zellsuspensionen (SR:-0,9429, $n=8$, $p > 0,02$).

Des weiteren lag ein hochsignifikanter Trend zu einer niedrigeren NK-Zellaktivität mit zunehmender Krankheitsdauer in allen Crohn-Patientengruppen, d.h. in der Gruppe CD gesamt, sowie den Gruppen CD 1 und CD 2 vor. Da ein ähnlicher Trend jedoch auch bei den Daten der entsprechenden Normalkontrollen vorlag, wenn diese in gleicher Weise mit der natürlich nicht zutreffenden Krankheitsdauer ihrer zugehörigen Patienten korreliert wurden. Dies weist darauf hin, daß es sich bei dieser Abhängigkeit der NK-Zellaktivität von der Krankheitsdauer bei den Patienten mit Morbus Crohn um einen rein zufälligen Befund handelt.

E. DISKUSSION

Die Untersuchungen dieser Studie stimmen überein mit denen von WEST et al. (1977), die bei Gesunden nach Entfernung phagozytierender Zellen eine Erhöhung der NK-Zellaktivität beobachteten. Die Häufigkeit, mit der dieser Anstieg bei Gesunden beobachtet wurde steht etwas im Gegensatz zu der beträchtlich niedrigeren Häufigkeit, mit der dieses Phänomen bei der antikörperabhängigen zellvermittelnden Zytotoxizität von AUER und Mitarbeitern (AUER et al., im Druck), beobachtet wurde.

Ein wichtigerer Befund ist die Beobachtung einer Abschwächung der NK-Zellaktivität sowohl in unaufgetrennten wie "gereinigten" mononukleären Zellsuspensionen von Patienten mit Morbus Crohn im Vergleich zu alters- und geschlechtsgleichen Gesunden. Sowohl Genese wie auch Art dieser Einschränkung sind gegenwärtig noch unklar.

Es fand sich zwar ein deutlicher supressiver Einfluß der Krankheitsaktivität auf die NK-Zellzytotoxizität in den "gereinigten" mononukleären Zellsuspensionen bei den Patienten mit Morbus Crohn. Die NK-Zellaktivität war aber auch bei den inaktiven Crohn-Patienten (CDAI <150) signifikant unter den Normalwerten, wenngleich sie bei den aktiven Patienten noch einmal signifikant niedriger als bei den inaktiven Crohn-Patienten war.

Die interessante umgekehrte Abhängigkeit der NK-Zellaktivität von der Krankheitsdauer der Crohn-Patienten ist offensichtlich rein zufällig. Denn auch bei den entsprechenden Kontrollpersonen ließ sich, wenn eine fiktive Krankheitsdauer der entsprechenden Crohn-Patienten angenommen wurde, eine ähnliche signifikante Abhängigkeit eruieren. Damit handelt es sich offensichtlich um ein rein zufälliges Zusammentreffen. Somit ließ sich keine sichere Abhängigkeit der eingeschränkten NK-Zellaktivität von der Krankheitdauer nachweisen. Somit könnte man spekulieren, daß diese Erniedrigung, da auch in der Gruppe CD 1 in gleichem Umfang wie in der Gruppe CD 2 vorhanden, primär sein könnte. Da jedoch die Abschwächung der NK-Zellaktivität auch bei Patienten mit entzündlichen in-

fektiösen Darmerkrankungen, außer Morbus Crohn und Colitis ulcerosa beobachtet wurde, bei diesen aber nicht etwa von einer primären Einschränkung der NK-Zellaktivität gesprochen werden kann - es handelt sich in der Regel um normale Infekte - weist dieser Befund doch möglicherweise auf die sekundäre Natur der Einschränkung der NK-Zellaktivität auch bei den Crohn-Patienten der Gruppe CD 1 hin. Dies spräche somit gegen eine vorbestehende Einschränkung der NK-Zellaktivität bei Patienten mit Morbus Crohn.

Es ist jedoch zu berücksichtigen und zu vergegenwärtigen, daß die NK-Zellaktivität bei den Patienten mit infektiösen entzündlichen Darmerkrankungen nur vorübergehend eingeschränkt ist, wogegen dieses Phänomen bei Morbus Crohn chronisch ist und bei aktiver Erkrankung zudem verstärkt wird. Trotz der, wie oben diskutiert, wahrscheinlich sekundären Natur der eingeschränkten NK-Zellaktivität könnte man somit dennoch zwei Dinge diskutieren. Erstens, daß die chronisch erniedrigte NK Zellaktivität das Angehen von Virusinfekten begünstigt, was das leichte Auftreten von Passagierviren erklären würde. Zweitens, daß bei Morbus Crohn diese erniedrigte NK-Zellaktivität Einfluß auf die bekannte hohe Malignität der Malignome des Gastrointestinaltraktes hat, die zwar in nur geringgradig, jedoch signifikant höherer Häufigkeit gefunden werden. Diese Hypothesen bleiben jedoch spekulativ, bis mehr über die in vivo Rolle der NK-Zellen im Rahmen der Infektabwehr und Tumorabwehr beim Menschen bekannt ist.

F. ZUSAMMENFASSUNG

Unter Verwendung der Lyse einer etablierten humanen lymphoblasten Zellinie in einem 4-Stunden-^{51}Cr-Freisetzungsassay wurde die spontane zellvermittelte Zytotoxizität von peripheren Blutlymphozyten, d.h. die Aktivität der sog. natürlichen Killer-(NK)Zellen untersucht. Dabei wurden die mononukleären Zellsuspensionen des peripheren Blutes von 34 Patienten mit Morbus Crohn, 11 Patienten mit entzündlichen Darmerkrankungen außer Morbus Crohn und Colitis ulcerosa, und von 45 Kontrollpersonen, die nach Alter und Geschlecht entsprechend den Patienten ausgewählt waren, untersucht.

Bei Morbus Crohn-Patienten war die natürliche Killerzellaktivität signifikant niedriger als bei entsprechenden Gesunden, und dies sowohl in den unaufgetrennten, wie auch in "gereinigten" mononukleären Zellsuspensionen, die von phagozytierenden plastikadhärenten Zellen befreit waren. Ein ähnliches Muster wurde auch in der Gruppe D beobachtet, wobei jedoch die NK-Zellaktivität in den "gereinigten" mononukleären Zellsuspensionen dieser Gruppe nur mäßig unter denen entsprechender Normalkontrollpersonen lagen.

Es fand sich sowohl bei den Crohn-Patienten als auch den erkrankten Kontrollpersonen, wie auch den gesunden Kontrollpersonen ein signifikanter Anstieg der NK-Zellaktivität nach Verarmung an phagozytierenden plastikadhärenten Zellen. Die Häufigkeit und das Ausmaß des Anstiegs war in allen Gruppen etwa gleich. Obwohl die NK-Zellaktivität in "gereinigten" Suspensionen von Crohn-Patienten sich umgekehrt proportional zur Krankheitsaktivität verhielt, zeigten auch inaktive Patienten eine signifikant eingeschränkte NK-Zellaktivität. Diese chronische Abschwächung der NK-Zellaktivität bei Morbus Crohn, die durch Krankheitsaktivität noch verstärkt wird, mag Bezug haben zum Auftreten von Viren im Darm sowie zur hohen Malignität der bei Morbus Crohn beobachteten Malignität der bei Morbus Crohn beobachteten Malignome des Gastrointestinaltraktes.

Herrn Priv. Doz. Dr. med. I.O. AUER möchte ich an dieser Stelle für die Überlassung des Themas, sowie für die mir bei meiner Arbeit zuteil gewordene Unterstützung besonders herzlich danken.

Herrn Professor Dr. med. H.A. KÜHN danke ich für die freundliche Übernahme des Korreferates und für die Möglichkeit diese Arbeit an der von ihm geleiteten Klinik durchzuführen.

G. LITERATURVERZEICHNIS

AKIRA, D. and TAKASUGI, M. (1977): Loss of specific natural cell mediated cytotoxicity with absorption of natural antibodies from serum. International Journal of Cancer 19, 747-755

AUER, I.O., GÖTZ, S., ZIEMER, E., MALCHOW, H. and EHMS, H. (1979): Immune status in Crohn's disease 3. Peripheral blood B-lymphocytes, enumerated by means of $F(ab)_2$-antibody fragments, Null and T Lymphocytes. GUT 20, 261-268

AUER, I.O., WECHSLER, W., ZIEMER, E., MALCHOW, H. and SOMMER, H. (1978): Immune status in Crohn's disease. 1. Leukocyte and lymphocyte subpopulations in peripheral blood. Scandinavian Journal of Gastroenterology 13, 561-571

AUER, I.O., ZIEMER, E. and SOMMER, H.: Immune status in Crohn's disease 4. In vitro antibody dependent cell mediated cytotoxicity in the peripheral blood. Klin. Wschr., im Druck

BEHELAK, Y. and RICHTER, M. (1975): Immunocompetent cells in man. III. The killer cell activity of normal circulating lymphocytes. Clinical Immunology and Immunopathology 4, 286-290

BEST, W.R., BECKTEL, J.M. SINGLETON, J.W. and KERN, F. (1976): Development of a Crohn's disease activity index. National cooperative Crohn's disease study. Gastroenterology 70, 439-444

BOLHUIS, R.L.H. (1978): Characterisation of natural killer (NK) cells and killer (K) cells in human blood: Discrimination between NK cell and K cell activities. 4th European immunology Meeting, Budapest, p.70 (abstract)

BOYUM, A. (1968): Isolation of mononuclear cells and granulocytes from human blood. Isolation of mononuclear cells by one centrifugation and of granulocytes by combining centrifugation and sedimentation by 1 g. Scandinavian Journal of Clinical and Laboratory Investigation 21 (Suppl. 97), 77-89

DE VRIES, J.E., CORNAIN, E. and RÜMKE, Ph. (1974): Cytotoxicity of non-T versus T-lymphocytes from melanoma patients and healthy donors on short- and longterm cultured melanoma cells. International Journal of Cancer 14, 427-434

DICKLER, H.B. (1974): Studies of the human lymphocyte receptor for heat aggregated or antigen-complexed immunoglobulin. J. Exp. Med. 140, 508

EREMIN, O., COOMBS, R.A., PLUMB, D. and ASHBY, J. (1978): Characterisation of the human natural killer (NK) cell in blood and lymphoid organs. International Journal of Cancer 21, 42-50

FIELDING, J.F., PRIOR, P., WATERHOUSE, J.A. and COOKE, W.T. (1972): Malignancy in Crohn's disease. Scandinavian Journal of Gastroenterology 7, 3-7

GITNICK, G.L., ARTHUR, M.H. and SLIBATA, J. (1976): Cultivation of viral agents from Crohn's disease. Lancet 215

GYÖRFFY, G.Y., PETRANYI, G.Y. and BENCZUR, M. (1978): The effect of human AB serum on the NK cell activity. 4th European Immunology Meeting, Budapest, 72 (abstract)

HALLER, O., HANSSON, M., KIESSLING, R. and WIGZELL, H. (1977): Role of nonconventional natural killer cells in resistance against syngeneic tumour cells in vivo. Nature 270, 609-611

HERBERMANN, R. (1977): In Cellular mechanismus in tumor immunity. Progess in Immunology III., pp. 799-801. Edited by T.E. MANDEL, Ch. CHEERS, C.S. HOSKING, J.F.C. McKENZIE and G.I.V. NOSSAL. North-Holland Publishing Company: Amsterdam-New York - Oxford

HERSEY, P., EDWARDS, A., EDWARDS, J.ADAMS, E., MILTON, G.W. and NELSON, D. (1975): Specificity of cell mediated cytotoxicity against human melanoma lines: evidence for "non-specific" killing by activated T-cells. International Journal of Cancer 16, 173-183

LEMON, S.M., HUTT, M. and HUANG, Y.T. (1977): Cytotoxicity of circulating leukocytes in cytomegalovirus mononucleosis. Clinical Immunology and Immunopathology 8, 513-519

PAPE, G.R., TROYE, M., SCHNEIDER, M. and PERLMAN, P. (1978): Effector cells and mechanism of human natural cytotoxicity against a myeloid cell line. 4th Europ. Immunol. Meeting, Budapest, p.70 (abstract)

PETRANYI, G.G., BENCZUR, M., ONODY, C.E. and HOLLAN, S.R. (1974): HL-A3,7 and lymphocyte cytotoxic activity. Lancet 1, 736

PETRANYI, G.G., KIESSLING, R., POVEY, S., KLEIN, G., HERZENBERG, L. and WIGZELL, H. (1976): The genetic control of natural killer cell activity and its association with a moloney lymphoma isograft. Immunogenetics 3, 5-28

SANTOLI, D., TRINCHIERE, G., MIJEWOSKI, C.M. and KOPROWSKI, H. (1976) : HLA-related control of spontaneous and antibody dependent cell mediated cytotoxic activity in humans. Journal of Immunology 117, 765-770

TAKASUGI, M., MICKEY, M.R. and TERASAKI, P. (1973): Reactivity of lymphocytes from normal persons on cultured tumour cells. Cancer Research 33, 2898-3002

TAKASUGI, M., RAMSEIER, A. and TAKASUGI, J. (1977): Decline of natural non selective cell mediated cytotoxicity in patients with tumour progression. Cancer Research 37, 413-418

TRACEY, D. (1977): In Cellular mechanisms in tumour immunity. Progess in Immunology III. pp. 799-801. Edited by T.E. MANDEL, Ch. CHEERS, C.S. HOSKING, J.F.C. Mc KENZIE and G.I.V. NOSSAL. North-Holland Publishing Company: Amsterdam - New York - Oxford

TRINCHIERI, G., DE MARCHI, M., MAYR, W., SAVI, M. and CAPELLINI R. (1973): Lymphocyte antibody lymphocytolytic interaction (LALI) with special emphasis on HLA. Transplantation proceedings 5, 1631-1646

WEEDON, D.D., SHORTER, R.G., ILSTRUP, D.M., HUIZENGA, K.A. and TAYLOR, W.F. (1973): Crohn's disease and Cancer. New England Journal of Medicine 289, 1099-1103

WEST, W.H., CANNON, G.B., KAY, D.H., BONNARD, G.D. and HERBERMANN, R.B.(1977): Natural cytotoxic reactivity of human lymphocytes against a myeloid cell line: characterisation of effector cells. Journal of Immunology 118, 355-361

ZARLING, J.M., NOWINSKI, R.C. and BACH, F.H. (1975): Lysis of leukemia cells by spleen cells of normal mice. Proceedings of the national Academy of Science (Washington) 72, 2780-2784

LEBENSLAUF

Ich, Jing-Shyan Lin, wurde am 28.10.1947 als erster Sohn des Beamten Chon-Yen Lin und seiner Frau Jin-Cheng Lin in der Hauptstadt von Taiwan (Taipeh) geboren. Mit dem 7. Lebensjahr besuchte ich die Volksschule in Taipeh für sechs Jahre und ging dann nach einer Abschlußprüfung auf die High-School, ebenfalls in Taipeh.

Nach weiteren sechs Jahren absolvierte ich eine Aufnahmeprüfung für die Universität Taipeh (Medical College) und studierte vier Jahre lang Pharmazie. Im Jahr 1969 schloß ich das Staatsexamen erfolgreich ab, leistete dann ein Jahr Militärdienst und arbeitete anschließend bis Anfang 1973 in einer pharmazeutischen Firma.

Ich hatte mich auch schon in den früheren Jahren sehr für Medizin interessiert und entschloß mich daher zu diesem Zeitpunkt zu einem Zweitstudium. Mit dem WS 1973/74 begann ich in Würzburg an der Julius-Maximilians-Universität mit dem Studium der Humanmedizin. Es folgten 1975 die ärztliche Vorprüfung. 1976 der 1. Teil der ärztlichen Prüfung und im August 1978 der 2. Teil der ärztlichen Prüfung. Im Oktober 1979 habe ich mit dem letzten Teil der ärztlichen Prüfung mein Studium abgeschlossen.

Während meines Deutschlandaufenthaltes heiratete ich 1974 Fräulein Chang, die hier Philosophie studiert. Wir haben 2 Kinder im Alter von 3 1/2 und 2 Jahren.

Jing-Shyan Lin

Dissertationsdruck
Schmitt & Meyer

Würzburg Ludwigkai 28a Tel. 7 23 80

Dissertationsdruck
Schmitt & Meyer

Würzburg Ludwigkai 28a Tel. 7 23 80